

PCT/KR 02/01462

REC'D 20 SEP 2002

RO/KR

29.08.2002

WIPO

PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 :
Application Number

특허출원 2002년 제 1149 호
PATENT-2002-0001149

출원 년 월 일 :
Date of Application

2002년 01월 09일
JAN 09, 2002

출원 인 :
Applicant(s)

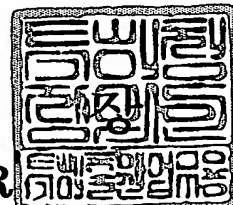
(주)넥스젠
NEXGEN



2002 년 08 월 29 일

특 허 청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0003
【제출일자】	2002.01.09
【발명의 명칭】	참외 형질전환체의 제조방법 및 형질전환 참외
【발명의 영문명칭】	Method for Preparing Transformed Cucumis melo L
【출원인】	
【명칭】	(주)넥스젠
【출원인코드】	1-2000-021126-1
【대리인】	
【명칭】	특허법인 세신(대표변리사 최홍순,김경철)
【대리인코드】	9-2001-100004-2
【지정된변리사】	최홍순 , 김경철 , 양부현
【포괄위임등록번호】	2001-064645-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이선교
【성명의 영문표기】	LEE, Sun
【주민등록번호】	580212-1010414
【우편번호】	305-390
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 108동 703호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유제근
【성명의 영문표기】	Y00, Je Geun
【주민등록번호】	571007-1024114
【우편번호】	300-768
【주소】	대전광역시 동구 용전동 한숲아파트 112동 301호
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대 리인 특허법인 세신(대표변리사 최홍순, 김경철) (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 4 면 4,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 8 항 365,000 원

【합계】 398,000 원

【감면사유】 소기업 (70%감면)

【감면후 수수료】 119,400 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 아그로박테리움 튜머페이션스를 이용한 참외 형질전환체의 제조방법 및 이로부터 제조되는 참외 형질전환체에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 (i) 참외 세포의 지놈 DNA에 삽입될 수 있고 다음과 같은 서열을 갖는 벡터가 내재되어 있는 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*)로 참외의 자엽을 감염시키는 단계: (a) 참외 세포 내에서 작동하는 복제 원점; (b) 참외 세포 내에서 전사를 촉진할 수 있는 프로모터; (c) 상기 프로모터에 기능적으로 연결된 외래 단백질을 코딩하는 구조 유전자 서열; 및 (d) 참외 세포 내에서 작동하여 RNA의 3' 말단에 폴리아데닐을 형성시키는 폴리아데닐 시그널 서열; (ii) 상기 감염된 참외 자엽을 성장 조절제로서 키네티ن 3.0-8.0 mg/ℓ 및 IAA (Indole-3-acetic acid) 0.5-3.0 mg/ℓ 가 함유된 재분화 배지에서 재분화시켜 싹을 형성하는 단계; 및 (iii) 상기 재분화된 싹을 NAA (α -naphthalene acetic acid) 0.05-0.3 mg/ℓ 가 함유된 발근 배지에서 발근시켜 형질전환 참외를 형성시키는 단계를 포함하는 참외 형질전환체의 제조방법 및 이로부터 제조되는 참외 형질전환체에 관한 것이다.

【대표도】

도 3

【색인어】

참외, 형질전환, 아그로박테리움

【명세서】**【발명의 명칭】**

참외 형질전환체의 제조방법 및 형질전환 참외{Method for Preparing Transformed Cucumis melo L}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 이용된 바이너리 벡터 pRD320의 유전자 지도;

도 2는 본 발명에 따라 제조된 형질전환체를 확인하기 위한 GUS 분석 결과를 나타내는 사진;

도 3은 본 발명의 참외 형질전환체를 확인하는 PCR 결과를 나타내는 겔 사진; 및

도 4는 본 발명의 참외 형질전환체를 확인하는 서던 블롯팅 결과를 나타내는 겔 사진.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<5> 본 발명은 식물의 형질전환에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 아그로박테리움 튜머페이션스를 이용한 참외 형질전환체의 제조방법 및 이로부터 제조되는 참외 형질전환체에 관한 것이다.

<6> 참외 (*Cucumis melo* L)는 수박과 더불어 한국에서 대표적인 여름 과일로서 재배 면적은 약 10,859 헥타르이고, 생산량은 약 32만 톤이다 (농림부, 1999년). 국내 종자시장 규모는 8,548 리터로 약 60억원 정도이다 (한국종자협회, 1999). 최근에 형질전환 기술을 이용하여 부가가치를 높인 작물들이 많이 시판되고 있다 (Ann, M.T. Transforming agriculture. *Chemical & Engineering* April:21-35(1999)). 그러나, 다른 박과 작물인 수박, 메론 및 오이에 대한 형질전환은 보고가 되어 있지만 (Choi, P. S. et al., Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 13:344-348(1994); Dong J. Z. et al., Transformation of melon(*Cucumis Melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. *Biotechnology* 9:858-863(1991); 및 Lee K. W. et al., *Agrobacterium tumefaciens*의 Binary Vector System을 이용하여 형질전환된 담배와 오이에서의 담배 모자이크 바이러스 외피단백질 유전자의 발현. 식물조직배양학회지 23(4):205-210(1996)), 참외에 대한 형질전환 보고는 아직 없다.

<7> 따라서 참외의 식물체 재분화 및 형질전환에 관한 연구는 아직까지는 많은 노력이 요구되고 있는 실정이다. 참외의 형질전환 기술의 확보는 향후 급변하는 소비자의 요구를 가장 빠른 시간 안에 수용 가능하고, 저비용으로 고품질 참외를 생산할 수 있는 가장 기반적인 기술이다.

- <8> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문이 참조되고 그 인용은 괄호내에 표시된다.
- 인용된 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 요지가 보다 명확하게 설명된다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <9> 본 발명자들은 상술한 업계의 오랜 요구를 해결하고자 예의 연구 노력한 결과, 참외 종자의 발아 조건, 아그로박테리움 튜머페이션스(*Agrobacterium tumefaciens*)와의 공동배양 방법 및 재분화 배지의 조성 등을 새롭게 구축하고, 이에 따르는 경우에는 아그로박테리움 튜머페이션스에 의한 참외 형질전환체의 제조가 보다 단시간에 효율적으로 발생하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- <10> 따라서, 본 발명의 목적은 아그로박테리움 튜머페이션스에 의한 참외 형질전환체의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- <11> 본 발명의 다른 목적은 상기한 아그로박테리움 튜머페이션스에 의한 참외 형질전환체의 제조방법에 의해 제조된 참외 형질전환체를 제공하는 데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- <12> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (i) 참외 세포의 지놈 DNA에 삽입될 수 있고 다음과 같은 서열을 갖는 벡터가 내재되어 있는 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*)로 참외의 자엽을 감염시키는 단계: (a) 참외 세포 내에서 작동하는 복제 원점; (b) 참외 세포 내에서 전사를 촉진할 수 있는 프로모터; (c) 상기

프로모터에 기능적으로 연결된 외래 단백질을 코딩하는 구조 유전자 서열; 및 (d) 참외 세포 내에서 작동하여 RNA의 3' 말단에 폴리아데닐을 형성시키는 폴리아데닐 시그널 서열; (ii) 상기 감염된 참외 자엽을 성장 조절제로서 키네티ن 3.0-8.0 mg/ℓ 및 IAA (Indole-3-acetic acid) 0.5-3.0 mg/ℓ 가 함유된 재분화 배지에서 재분화시켜 신초를 형성하는 단계; 및 (iii) 상기 재분화된 신초를 NAA (α -naphtalene acetic acid) 0.05-0.3 mg/ℓ 가 함유된 발근 배지에서 발근시켜 형질전환 참외를 형성시키는 단계를 포함하는 참외 형질전환체의 제조방법을 제공한다.

<13> 본 발명자들은 참외에 대한 효율적인 형질전환법을 개발하기 위하여, 국내의 4 종의 참외 품종을 대상으로 자엽 절편에서 부정아를 유도하고 높은 빈도로 재분화 개체를 얻을 수 있는 재분화 조건 및 아그로박테리움 튜머페이션스를 이용한 효율적인 참외의 형질전환 조건을 얻었다.

<14> 이와 같은 본 발명을 보다 상세하게 설명하면 다음과 같다:

<15> I. 형질전환 재료의 준비

<16> 참외의 형질전환 재료로서 이용될 수 있는 것은 잎, 줄기 및 엽병 등이다. 이러한 재료는 식물의 다양한 부분에서 얻을 수 있으나, 가장 바람직하게는 종자로부터 얻는다. 종자는 사용하기 전에 미리 염소 (특히, 소듐 하이포클로라이드) 등과 같은 소독제를 이용하여 멸균하는 것이 바람직하다.

<17> II. 종자의 발아

<18> 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 종자의 발아시 이용되는 배지는 MS, B5, LS, N6 및 화이트'스 등과 같은 영양 기본 배지, 에너지원 그리고 비타민을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 에너지원은 보다 바람직하게는 당류이고, 가장 바람직하게는 수크로스이다. 또한, 상기 비타민은 바람직하게는 니코틴산, 티아민 및 피리독신 등을 포함한다. 한편, 본 발명의 발아 배지는 pH 변화를 완충시키는 역할을 하는 MES(2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid Monohydrate)를 추가적으로 포함할 수 있고, 고체 지지체로서 아가를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 발아 배지에는 식물 성장 조절제는 첨가하지 않는다.

<19> III. 형질전환 조직의 준비

<20> 본 발명에서 이용될 수 있는 조직은 종자의 발아로부터 생성된 모든 조직이 이용될 수 있으나, 바람직하게는 자엽 및 배축을 이용할 수 있고, 가장 바람직하게는 자엽을 이용하는 것이다. 자엽을 발아된 종자로부터 얻은 경우에는 생장점이 완전히 배제되도록 채취하는 것이 바람직하다.

<21> IV. 아그로박테리움 튜머페이션스에 의한 감염

<22> 참외 세포의 형질전환은 Ti 플라스미드가 내재되어 있는 아그로박테리움 튜머페이션스로 실시한다 (Depicker, A. et al., Plant cell transformation by *Agrobacterium*

plasmids. In Genetic Engineering of Plants, Plenum Press, New York (1983)). 보다 바람직하게는 바이너리 (binary) 벡터 시스템을 이용하는 것이다 (An, G. et al., "Binary vectors" In Plant Gene Res. Manual, Martinus Nijhoff Publisher, New York(1986)). 상기한 바이너리 벡터는 예컨대, pBin19, pRD400, pRD320 등이 있다.

<23> 본 발명에 이용되는 바이너리 벡터는 기본적으로 (a) 참외 세포 내에서 작동하는 복제 원점; (b) 참외 세포 내에서 전사를 촉진할 수 있는 프로모터; (c) 상기 프로모터에 기능적으로 연결된 외래 단백질을 코딩하는 구조 유전자 서열; 및 (d) 참외 세포 내에서 작동하여 RNA의 3' 말단에 폴리아데닐을 형성시키는 폴리아데닐 시그널 서열을 포함한다. 또한, 바람직하게는 상기 벡터에는 선택 표지로서 항생제 (예: 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자를 포함한다. 한편, 상기 벡터는 추가적으로 리포터 물질(예: 루시페라아제, β -글루쿠로니다아제 등)을 인코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 상기 바이너리 벡터내에 이용될 수 있는 프로모터는 예컨대, 콜리플라우어 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 1' 프로모터, 2' 프로모터 또는 노팔린 합성효소 (nos) 프로모터를 포함한다. 한편, 상기 외래 단백질을 인코딩하는 구조 유전자 서열은 얻고자 하는 바람직한 형질에 따라 결정된다. 예컨대, 제초제 (글라이포세이트, 설폰닐우레아 등) 저항성 유전자, 바이러스 저항성 유전자, 해충 저항성 유전자 (예: Bt 유전자), 악조건 (가뭄, 기온, 염도) 저항성 유전자, 품질향상을 위한 유전자 (예; 당도 증가, 과숙 지연 등), 의료용 단백질 생산 관련 유전자(EGF, 각종 질병의 항원 또는 항체, 인슐린 등), 기능성 화장품 생산 관련 유전자 (알부민, 항균성 펩타이드 등) 등이 있다.

<24> 상기한 벡터를 내재하고 있는 아그로박테리움에 의한 식물 세포의 감염은 당업계에 공지된 통상적인 방법을 이용할 수 있으나, 가장 바람직하게는 상술한 바와 같이 생장점이 배제되도록 채취한 자엽을 절단하고, 자엽 단편을 아그로박테리움의 배양액에 침지시켜 공동배양함으로써 아그로박테리움이 자엽에 감염되도록 하는 것이다. 이와 같은 감염은 바람직하게는 키네티ن 3.0-8.0 mg/ℓ, IAA (Indole-3-acetic acid) 0.5-3.0 mg/ℓ 및 50-200 μM의 아세토시린곤이 함유된 감염 배지에서 실시한다. 키네티ن 및 IAA는 성장 조절제이고, 아세토시린곤은 아그로박테리움의 식물로의 형질전환을 보조하는 것이다.

<25> V. 재분화

<26> 상기 아그로박테리움에 의해 형질전환된 식물 조직의 재분화는 엄격하게 조절된 성분과 성분양을 포함하는 재분화 배지에서 실시되어야 한다.

<27> 본 발명에 따르면, 재분화 배지는 MS, B5, LS, N6 및 화이트'스 등과 같은 영양 기본 배지, 에너지원 그리고 비타민을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 에너지원은 보다 바람직하게는 당류이고, 가장 바람직하게는 수크로스이다. 상기 비타민은 바람직하게는 니코틴산, 티아민 및 피리독신 등을 포함한다. 한편, 본 발명의 재분화 배지는 pH 완충 역할을 하는 MES를 추가적으로 포함할 수 있고, 고체 지지체로서 아가를 추가적으로 포함할 수 있다.

<28> 본 발명의 재분화 배지에는 식물 성장 조절제가 포함된다. 식물 성자 조절제 중 함유되는 시토키닌은 6-벤질아미노퓨린, 키네티ن, 제아틴, 이소펜틸아데노신 등을 포함하

나, 이에 한정되는 것은 아니며, 가장 바람직하게는 키네티인이 이용된다. 본 발명의 재분화 배지에는 옥신계 성장 조절제 (예: α -나프탈렌아세트산 (NAA), 인돌아세트산 (IAA), (2,4-디클로로페녹시) 아세트산)도 필수적으로 포함되는 데, 가장 바람직하게는 IAA를 이용하는 것이다. 재분화 배지에 포함되는 키네티인의 양은 5.0-7.0 mg/ℓ 이 바람직하고, IAA의 양은 1.0-2.0 mg/ℓ 이 바람직하다.

<29> 본 발명의 재분화 배지에는 상기한 성장 조절제 이외에 재분화를 촉진하는 것으로 알려진 CuSO_4 또는 카제인 가수분해물을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 CuSO_4 를 이용하는 것이다. CuSO_4 는 0.5-2.0 mg/ℓ 가 바람직하다.

<30> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 형질전환된 조직을 선별할 수 있도록 항생제 (예: 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등)를 추가적으로 포함한다.

<31> 재분화 배지에서의 배양 온도는 25℃ ± 1℃가 가장 바람직하고, 광배양:암배양의 비율은 16시간:8시간이 가장 바람직하고, 조도는 약 4,000 Lux가 가장 바람직하다.

<32> 상기한 조건에 따라 재분화 배지에서 형질전환된 참외 조직을 배양하면 캘러스 상태를 거쳐 재분화되어 신초가 형성된다.

<33> VI. 발근

<34> 재분화된 조직은 본 발명의 발근 배지에서 발근시켜 형질전환 참외를 얻는다. 본 발명의 발근 배지는 MS, B5, LS, N6 및 화이트'스 등과 같은 영양 기본 배지, 에너지원 그리고 비타민을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 에너지원은 보다 바람직

하계는 당류이고, 가장 바람직하게는 수크로스이다. 상기 비타민은 바람직하게는 니코틴산, 티아민 및 피리독신 등을 포함한다. 한편, 본 발명의 재분화 배지는 pH 완충 역할을 하는 MES를 추가적으로 포함할 수 있고, 고체 지지체로서 아가를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 발근 배지에는 식물 성장 조절제로서 시토키닌은 거의 이용되지 않고, 옥신이 주로 이용된다. 상기 옥신계 성장 조절제로서는 α -나프탈렌아세트산 (NAA), 인돌아세트산, (2,4-디클로로페녹시) 아세트산 등이 이용될 수 있고, 가장 바람직하게는 NAA이다. NAA의 양은 0.08-0.2 mg/ℓ가 바람직하다.

<35> VII. 형질전환체의 확인

<36> 본 발명에 의해 제조된 참외 형질전환체는 당업계에 공지된 방법에 의해 실시할 수 있다. 예컨대, 형질전환 참외의 조직으로부터 분리한 DNA 시료를 이용하여 PCR을 실시함으로써 형질전환에 의해 참외의 지놈에 삽입된 외래 유전자를 용이하게 확인할 수 있다. 또한, Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)에 개시된 서던 블롯팅 및 노던 블롯팅에 의해서도 형질전환체를 확인할 수 있다.

<37> 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 (i) 키네티ن 3.0-8.0 mg/ℓ, IAA (Indole-3-acetic acid) 0.5-3.0 mg/ℓ 및 50-200 μ M의 아세토시린곤이 함유된 감염 배지에서 참외 세포의 지놈 DNA에 삽입될 수 있고 다음과 같은 서열을 갖는 벡터가 내재되어 있는 아그로박테리움 튜머페이션스 (

Agrobacterium tumefaciens)로 참외의 자엽을 감염시키는 단계: (a) 참외 세포 내에서 작동하는 복제 원점; (b) 참외 세포 내에서 전사를 촉진할 수 있는 프로모터; (c) 상기 프로모터에 기능적으로 연결된 외래 단백질을 코딩하는 구조 유전자 서열; 및 (d) 참외 세포 내에서 작동하여 RNA의 3' 말단에 폴리아데닐을 형성시키는 폴리아데닐 시그널 서열; (ii) 상기 감염된 참외 자엽을 성장 조절제로서 키네티ن 5.0-7.0 mg/ℓ 및 IAA 1.0-2.0 mg/ℓ, 그리고 재분화 촉진제로서 CuSO₄ 0.5-2.0 mg/ℓ가 함유된 재분화 배지에서 재분화시켜 신초를 형성하는 단계; 및 (iii) 상기 재분화된 신초를 NAA 0.08-0.2 mg/ℓ가 함유된 발근 배지에서 발근시켜 형질전환 참외를 형성시키는 단계를 포함하는 참외 형질전환체의 제조방법을 제공한다.

<38> 본 발명의 또 다른 양태는 상기한 본 발명의 방법에 의해 제조된 참외 형질전환체를 제공한다.

<39> 상술한 본 발명의 참외 형질전환체의 제조방법은 하기의 실시예에서 확인할 수 있듯이, 형질전환 효율 및 재분화 효율이 매우 높을 뿐만 아니라, 참외 형질전환체 제조의 재현성이 매우 우수하다.

<40> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본

발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<41> 실시예 1: 식물 조직의 준비

<42> 참외 4품종 (사계절꿀 참외, 금노다지 은천 참외, 황진이 은천 참외 및 금황 은천 참외)을 재분화 및 형질전환 실험에 이용하였다. 각 품종의 종자들은 4℃에 보관하면서 물리적인 방법으로 종피를 제거한 후 종자를 1% NaOCl에서 30분 동안 소독한 후 멸균수로 4회 세척하였다. 이어, 소독한 종자를 건조한 후 파종 배지(1/2MSB5, 1.0% 수크로스 및 0.6% 아가, pH 5.6)에 종자를 파종하고, 1주일 동안 26℃, 4,000 룩스 및 16시간/8시간 (낮/밤)의 조건으로 광배양하여 발아시켰다. 그런 다음, 형성된 자엽을 재분화 및 형질전환용 시료로 사용하였다.

<43> 실시예 2: 식물 조직의 형질전환

<44> 상기 실시예 1에서 형성된 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 자엽을 채취하였다.

<45> 한편, 첨부한 도 1에 도시된 바이너리 벡터 pRD320 (Omirulleh, S. et al., Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. *Plant. Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng.*, 21(3):415-428(1993))에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머페이션스(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101(Mp90); *Plant-cell-rep.*, 15(11):799-803(1996))를 100 μ M 아세토시링곤 (acetosyringone)이 함유된 슈퍼 브로스

(Super broth: 37 g/ℓ Brain heart infusion broth(Difco) 및 0.2% 수크로스, pH 5.6) 에서 18시간 동안 28℃에서 배양한 다음, 배양액을 감염 배지를 이용하여 20배로 희석하였다. 상기 감염 배지 (pH 5.6)는 MSB5 (Murashige & Skoog medium including Gamborg B5 vitamins), 3.0% 수크로스, 0.5 g/ℓ MES [2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid Monohydrate], 6.0 mg/ℓ 키네티ن, 1.5 mg/ℓ IAA (Indole-3-acetic acid), 1.0 mg/ℓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 μM 아세토시린곤 및 5% DMSO (dimethylsulfoxide)를 포함한다.

첨부 도 1의 유전자 지도에서, LB 및 RB는 각각 T-DNA의 좌측 및 우측 보더 (border), Tnos는 nos 유전자의 종결 서열, P35S는 CaMV (Cauliflower mosaic virus) 35S 인핸서 서열, AMV는 알팔마 모자이크 바이러스 인핸서 서열, *gus::nptII*는 글루쿠로니다아제:: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 융합 유전자, 그리고 *pat*는 포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라아제를 코딩하는 서열을 나타낸다.

<46> 이어, 상기 자엽을 감염 배지 40 ml에 침지시키고 침지시켜 20분 동안 배양하여, 아그로박테리움 튜머페이션스에 의해 자엽이 감염되도록 하였다. 그런 다음, 자엽 바깥면이 위로 향하도록 공동배양 배지로 옮겼다. 상기 공동배양 배지는 MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/ℓ MES, 6.0 mg/ℓ 키네티ن, 1.5 mg/ℓ IAA, 1.0 mg/ℓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.6% 아가, 100 μM 아세토시린곤 및 5% DMSO를 포함한다. 그런 다음, 암배양 조건 (26±℃, 24시간 밤)에서 3일 동안 공동배양 하였다.

<47> 실시예 3: 재분화

<48> 공동배양이 종료된 다음, 자엽으로부터 재분화를 유발하여 싹초를 형성시키고 그 중에서 형질전환된 싹초를 선별하기 위하여, 자엽을 재분화 배지 (선발 배지)에 치상하

고, 25℃ 온도와 4,000 Lux 조도에서 16시간 광조건 환경에서 3주일 동안 광배양 하여 신초의 발생을 일차적으로 유도 하였다. 상기 재분화 배지 (pH 5.6)는 MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/ℓ MES, 6.0 mg/ℓ 키네티ن, 1.5 mg/ℓ IAA, 1.0 mg/ℓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.6% 아가, 100 mg/ℓ 카나마이신 및 500 mg/ℓ 카르베니실린을 포함한다. 이어, 재분화된 신초를 새로운 선발 배지에 이식하고 2주 동안 광배양 하였다.

<49> 그런 다음, 신장된 신초를 발근 배지에 이식하고, 2주일 동안 배양하고, 형질전환 된 것으로 추정되는 발근된 신초를 선별하였다. 상기 발근 배지 (pH 5.6)는 MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/ℓ MES, 0.1 mg/ℓ NAA (α -Naphthalene Acetic Acid), 1.0 mg/ℓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.6% 아가, 100 mg/ℓ 카나마이신 및 500 mg/ℓ 카르베니실린을 포함한다.

<50> 최종적인 형질전환율은 다음 표 1과 같다:

<51> 【표 1】

품 종	처리 절편수	GUS(+) 신초수*	형질전환율** (%)
금황은천참외	290	12	4.1
금노다지은천참외	310	43	13.9
황진이은천참외	300	19	6.3
사계절꿀참외	360	0	0

* 신초 중에서 하기 실시예 4의 GUS 분석에 의해 청색으로 발현되는 신초수
 ** [GUS(+) 신초수/처리 절편수] x 100

<52> 표 1에서 알 수 있듯이, 본 발명의 방법에 의해 형질전환율이 가장 높은 품종은 금노다지은천 참외이고, 14.7%의 높은 형질전환율을 나타내었다. 이와 같은 형질전환율은 기존의 어떠한 문헌에도 보고된 적이 없는 경이로운 값이다. 한편, 금황은천, 금노다지은천 및 황진이은천 품종의 형질전환율의 평균 값은 8.2%로 높은 수치를 나타내었다.

<53> 실시예 4: 형질전환의 확인

<54> 상기 실시예에서 형질전환체의 확인은 다음과 같이 실시 하였다:

<55> 실시예 4-1. GUS 분석

<56> β -글루쿠로니다아제 (glucuronidase) 활성을 측정하기 위하여, X-GluA (5-Bromo-4-Chloro-3-Indole- β -D-Glucuronic Acid) 용액 (100 mM NaPO₄, pH 7.0, 3 mM K₃[Fe(CN)₆], 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 및 2 mM X-GluA)에 검정할 시료를 침지하고, 10분 동안 진공으로 처리한 후 37℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 반응한 조직을 0.5% NaOCl 용액에 10분 동안 두어 엽록소를 제거한 후 조직의 염색 정도와 모양을 육안으로 관찰하였다.

<57> 참외는 담배 또는 애기장대 등 다른 작물에 비해 선발 배지에서 비형질전환 신초가 많이 발생하였으며 특히 비형질전환체는 항생제가 첨가된 배지에서도 뿌리까지 발생하였다. 그러나, 뿌리가 신장하는 현상은 관찰되지 않았다. 뿌리가 왕성하게 신장한 신초들의 GUS 활성을 분석한 결과 잎, 덩굴손, 줄기 등에서 강하게 유전자가 발현됨을 관찰할 수 있었다 (참조: 도 2).

<58> 실시예 4-2. PCR 분석

<59> 선발 배지에서 형질전환된 것으로 선발된 신초 10 mg을 0.5 M NaOH 100 μ l에 파쇄한 용액에 100 mM Tris (pH 8.0) 용액 500 μ l을 첨가하였다. 파쇄되어 있는 신초 시료를 포함하고 있는 Tris 500 μ l 용액에서 1.0 μ l를 PCR 주형 DNA로 사용하였다. PCR 프

라이머는 *nptII* 프라이머 (센스 프라이머: 5'-GAT GGA GTG CAC GCA GGT-3' 및 안티센스 프라이머: 5'-TCA GAA GAA CTC GTC AAG-3')를 사용하였다. PCR 증폭은 다음과 같은 용액을 구성하여 반응시켰다. 50 ng의 주형 DNA, 1.0 μ l의 10x PCR 반응 완충액 (100 mM Tris · HCl, pH 8.8, 15 mM MgCl₂, 50 mM KCl 및 1% Triton X-100), 2.0 μ l의 dNTP (각각 2.5 mM), 0.25 μ l (100 pmol)의 센스 및 안티센스 프라이머, 그리고 0.25 μ l (2 Unit)의 Taq DNA 중합효소를 첨가하고 멸균 증류수로 최종 부피를 25 μ l가 되도록 첨가하였다.

<60> 유전자 증폭 반응 과정은 96°C에서 2분간 전변성시키고 난 후, 94°C에서 30초간 변성, 55°C에서 30초간 어닐링, 72°C에서 2분간 신장반응시켰다. 이를 35회 반복하고 72°C에서 최종 신장반응 10분간 실행하고 4°C에서 보관하였다. 증폭된 *nptII* 유전자를 1.0%의 아가로스가 첨가된 겔에 로딩하여 TBE 전기영동 완충용액에서 50-100V 전압으로 60-90분간 전기영동한 후, 0.002%의 EtBr에 20분간 넣었다가 증류수로 수세하여 UV 조명기에 옮겨 증폭된 DNA 단편의 분자량을 관찰하였다 (참조: 도 3). 도 3에서 1번 레인은 크기 마커, 2번 레인은 금황은천 참외, 3번 레인은 사계절꿀 참외, 4번 레인은 금노다지 참외 및 5번 레인은 황진이은천 참외에로부터 얻은 PCR 산물을 각각 로딩한 것이다.

<61> 금황은천, 금노다지은천 및 황진이은천 품종의 재분화된 신초의 *nptII* 유전자를 PCR로 증폭하여 800 bp 크기의 *nptII* DNA 단편을 획득하였으며, GUS 반응 음성인 형질전환하지 않은 사계절 꿀참외 품종에서는 증폭되는 유전자가 나타나지 않았다.

<62> 실시예 4-3. 서던 블롯팅 분석

<63> 서던 분석은 Amersham사에서 제공한 ECL 키트 매뉴얼을 참조하여 수행하였다.

식물 조직 2 g을 액체 질소를 넣고 막자사발에서 파쇄한 후 파쇄 완충액 5 ml을 첨가하였다. 이어, 1% 프로테이나아제 K 40 μ l 및 10% SDS 2.5 ml을 첨가하여 60°C에서 1시간 동안 배양하였다. 5 M NaCl 2.5 ml 및 10% CTAB 2 ml을 넣고 천천히 흔든 후 다시 60°C 배양기에서 1시간 배양하고, 5°C에서 8000 x g로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 새 튜브로 옮기고 메틸렌 클로라이드: 이소아밀알코올 (24:1)을 같은 양으로 넣고 혼합한 후 5°C에서 8000 x g로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 RNase A (10 mg/ l)를 20 μ l 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 메틸렌 클로라이드: 이소아밀알코올 (24:1)을 동량을 첨가하여 5°C에서 8000 x g로 10분간 원심분리 하였다. 새 튜브에 상층액을 옮긴 후 냉동 저장한 이소프로판올을 동량 첨가하여 혼합하였다. 그런 다음, 5°C에서 8000 x g로 15분간 원심분리한 다음, 상층액은 버리고 70% 에탄올로 튜브에 남아있는 DNA 펠릿을 세척하였다.

<64> 상온에서 하룻밤동안 건조한 후 멸균증류수를 넣어 DNA를 용해하고, 순수 정제된 DNA 용액을 제한효소 *Hind*III로 처리하여 37°C에서 24시간 동안 반응한 후 0.8% 아가로스 겔 (0.5 X TBE)에서 전기영동 하였다. 전기영동한 겔을 0.25 M HCl 용액에서 브로모페놀 블루색이 노란색이 될 때까지 (약 10-12분) 반응 후 용액을 버리고 증류수로 세척하였다. 변성액 (NaCl 1.5 M 및 NaOH 0.5 M)을 넣고 약 30분간 천천히 흔들면서 반응시키고, 용액을 버리고 겔을 증류수로 세척하고 중성화액 (NaCl 1.5 M, Tris·HCl 0.5 M, pH 7.5)을 첨가하여 30분 정도 흔들면서 반응시켰다.

<65> 반응이 끝난 후 용액을 제거하고 증류수로 세척하고, 다시 중성화액을 넣고 30분간 흔들면서 반응시켰다. 그리고 20X SSC로 채운 유리 평접시에 지지판을 만들어 3MM 페이퍼, 젤, 나일론막, 3MM 페이퍼 쉬트, 페이퍼 타월 및 무게를 차례대로 올려 모세관 블롯팅을 실시하였다. PAT 유전자를 ^{32}P -dCTP로 표지하여 혼성화 반응시 프로브로 사용하였다.

<66> 분석 결과, 형질전환체로 추정되는 금황은천의 3 개체 중에서 2 개체 (레인 1 및 3)는 유전자 두 개가 삽입되었고 한 개체 (레인 2)는 비형질전환체임이 확인되었다. 그리고 금노다지은천의 2 개체 (레인 4 및 5)와 황진이은천 (레인 6 및 7)의 2 개체는 유전자가 하나만 삽입된 것을 알 수 있었다 (참조: 도 4).

【발명의 효과】

<67> 본 발명은 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*)에 의한 참외 형질전환체의 제조방법 및 그로부터 제조되는 참외 형질전환체를 제공한다. 본 발명의 참외 형질전환체의 제조방법은 형질전환 효율 및 재분화 효율이 매우 높으며, 참외 형질전환체 제조의 재현성이 매우 우수하다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

다음의 단계를 포함하는 참외 형질전환체의 제조방법:

(i) 참외 세포의 지놈 DNA에 삽입될 수 있고 다음과 같은 서열을 갖는 벡터가 내재되어 있는 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*)로 참외의 자엽을 감염시키는 단계: (a) 참외 세포 내에서 작동하는 복제 원점; (b) 참외 세포 내에서 전사를 촉진할 수 있는 프로모터; (c) 상기 프로모터에 기능적으로 연결된 외래 단백질 코딩하는 구조 유전자 서열; 및 (d) 참외 세포 내에서 작동하여 RNA의 3' 말단에 폴리아데닐을 형성시키는 폴리아데닐 시그널 서열;

(ii) 상기 감염된 참외 자엽을 성장 조절제로서 키네티ن 3.0-8.0 mg/ℓ 및 IAA (Indole-3-acetic acid) 0.5-3.0 mg/ℓ 가 함유된 재분화 배지에서 재분화시켜 신초를 형성하는 단계; 및

(iii) 상기 재분화된 신초를 NAA (α -naphtalene acetic acid) 0.05-0.3 mg/ℓ 가 함유된 발근 배지에서 발근시켜 형질전환 참외를 형성시키는 단계.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (ii)의 재분화 배지에서의 키네티んの 양은 5.0-7.0 mg/ℓ 인 것을 특징으로 하는 참외 형질전환체의 제조방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (ii)의 재분화 배지에서의 IAA의 양은 1.0-2.0 mg/ℓ 인 것을 특징으로 하는 참외 형질전환체의 제조방법.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (iii)의 발근 배지에서의 NAA의 양은 0.08-0.2 mg/ℓ 인 것을 특징으로 하는 참외 형질전환체의 제조방법.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (i)은 키네티ن 3.0-8.0 mg/ℓ, IAA 0.5-3.0 mg/ℓ 및 50-200 μM의 아세토시린곤이 함유된 감염 배지에서 실시되는 것을 특징으로 하는 참외 형질전환체의 제조방법.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (ii)의 재분화 배지는 0.5-2.0 mg/ℓ의 CuSO₄를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 참외 형질전환체의 제조방법.

【청구항 7】

다음의 단계를 포함하는 참외 형질전환체의 제조방법:

(i) 키네티 3.0-8.0 mg/ ℓ , IAA (Indole-3-acetic acid) 0.5-3.0 mg/ ℓ 및 50-200 μ M의 아세토시린곤이 함유된 감염 배지에서 참외 세포의 지놈 DNA에 삽입될 수 있고 다음과 같은 서열을 갖는 벡터가 내재되어 있는 아그로박테리움 튜메페이스스 (*Agrobacterium tumefaciens*)로 참외의 자엽을 감염시키는 단계: (a) 참외 세포 내에서 작동하는 복제 원점; (b) 참외 세포 내에서 전사를 촉진할 수 있는 프로모터; (c) 상기 프로모터에 기능적으로 연결된 외래 단백질을 코딩하는 구조 유전자 서열; 및 (d) 참외 세포 내에서 작동하여 RNA의 3' 말단에 폴리아데닐을 형성시키는 폴리아데닐 시그널 서열;

(ii) 상기 감염된 참외 자엽을 성장 조절제로서 키네티 5.0-7.0 mg/ ℓ 및 IAA 1.0-2.0 mg/ ℓ , 그리고 재분화 촉진제로서 CuSO_4 0.5-2.0 mg/ ℓ 가 함유된 재분화 배지에서 재분화시켜 신초를 형성하는 단계; 및

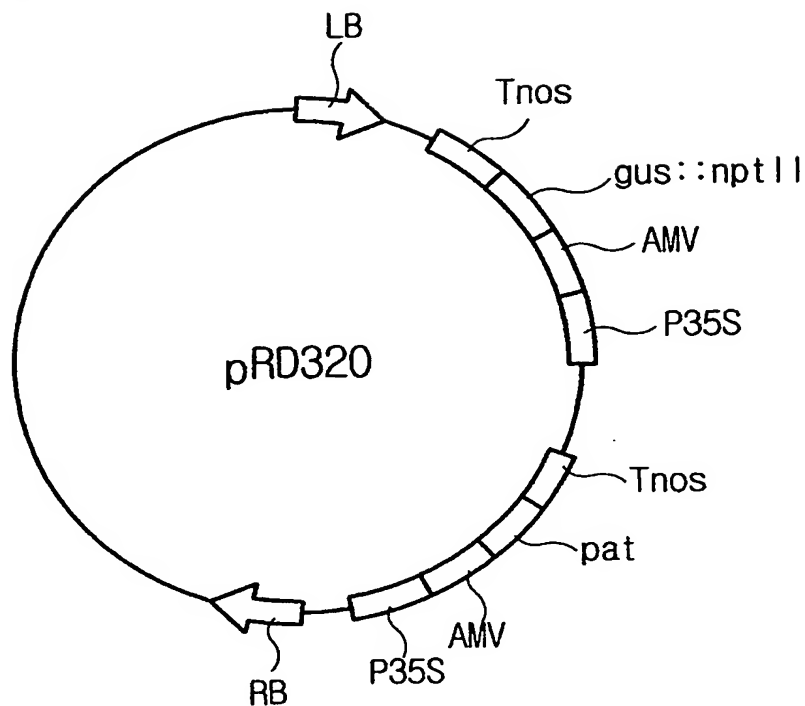
(iii) 상기 재분화된 신초를 NAA 0.08-0.2 mg/ ℓ 가 함유된 발근 배지에서 발근시켜 형질전환 참외를 형성시키는 단계.

【청구항 8】

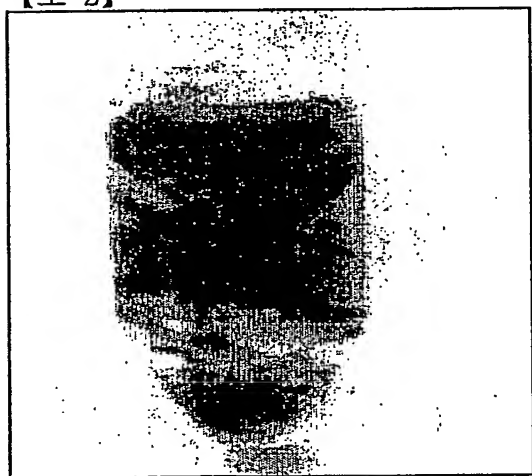
선행하는 청구항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 참외 형질전환체.

【도면】

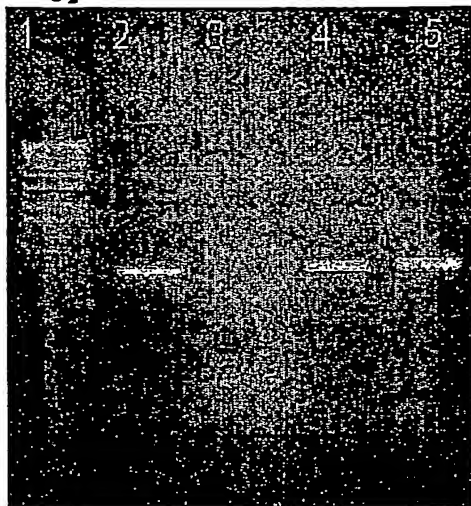
【도 1】



【도 2】



【도 3】



【도 4】

